

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

07. 08. 2004

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 33 406.8

Anmeldetag: 15. Juli 2003

Anmelder/Inhaber: Protagen AG, 44227 Dortmund/DE

Bezeichnung: T-regulatorische-Zellen enthaltend Galectine zur Therapie und Diagnose von Erkrankungen

IPC: C 12 N, A 61 K, C 07 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. Juli 2004
 Deutsches Patent- und Markenamt
 Der Präsident
 Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Stremme".

Stremme**BEST AVAILABLE COPY**

Anmelder:
Protagen AG
Emil-Figge-Str. 76A
44227 Dortmund

33410020

15.07.2003
ABU/CSI

**Titel: T-regulatorische-Zellen enthaltend Galectine zur
Therapie und Diagnose von Erkrankungen**

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft T-regulatorische-Zellen enthaltend Galectine zur Therapie und Diagnose von Erkrankungen, insbesondere von Allergien, Autoimmunerkrankungen, insbesondere Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose oder Morbus Crohn, Chronischer Inflammation, Immundefizienz-Erkrankungen, Transplantatabstoßung und Krebserkrankungen.

T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von Tumorzellen, bei allergischen Erkrankungen und der

Abstoßung von Transplantaten. Chronische Krankheiten mit inflammatorischem Hintergrund wie Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose oder Morbus Crohn sind dadurch charakterisiert, dass sie alle Autoimmunerkrankungen sind, die durch eine fehlgeleitete Reaktion einer zentralen Zellpopulation des Immunsystems, der T-Zellen, verursacht werden. Verschiedene Mechanismen kontrollieren die Unterscheidung zwischen körpereigenen und nicht-körpereigenen. Hierzu gehört auch die Deletion von autoreaktiven T-Zellen im Thymus und die Induzierung von Anergie in der Peripherie. Zusätzlich zu diesen Mechanismen haben neuere Forschungsarbeiten gezeigt, dass im normalen Organismus spezifische Immunzellen existieren, die unerwünschte Reaktionen des Immunsystems gegen körpereigene Proteine (Autoantigene) aktiv unterdrücken können. Diese Zellen werden regulatorische T-Zellen (kurz: Treg, im Folgenden) genannt und werden charakterisiert durch die Koexpression der Oberflächenproteine CD4 und CD25. Treg hemmen Effektorzellen, wie z. B. zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen, aber auch Dendritische Zellen. Ihre Depletion führt zu einem Auftreten von einer Reihe von Autoimmunkrankheiten aber auch zu einer verbesserten Tumoralabwehr (Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J. Immunol. 155, 1151-1164 (1995)). Diese Befunde stützen die These einer ambivalenten Funktion der Treg. Sie sind in der Lage, die Immunantwort

sowohl zu steigern, als auch zu unterdrücken und stellen damit einen wichtigen Faktor in der Regulation der Immunantwort dar. Die Steigerung der supprimierenden Funktion der regulatorischen T-Zellen wird als hilfreich für die Therapie von Erkrankungen des Immunsystems angesehen, während eine Hemmung der supprimierenden Eigenschaften die Tumorabwehr unterstützen kann.

Verschiedene Populationen humaner regulatorischer T-Zellen konnten ex vivo charakterisiert bzw. in vitro induziert werden, wobei die CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen als residente Subpopulation ca. 5-10% der CD4+ T-Zellen im peripheren Blut ausmachen. Durch eine Kombination von positiver und negativer Selektion mit immunomagnetischen Beads können die CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen mit hoher Reinheit aus z.B. Blut oder Milzgewebe isoliert werden, um sie funktionell zu analysieren und zu charakterisieren (Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuettenberg A., Knop J. und Enk A.H. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood J. Exp. Med. 193, 1285-1294 (2001)). Frisch isolierte CD4+CD25+ Treg proliferieren nicht nach allogener oder polyklonaler Stimulierung aber supprimieren antigenunspezifisch und zellkontaktabhängig die Aktivierung und Zytokinfreisetzung von konventionellen CD4+ und CD8+ T-Zellen (Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuettenberg A., Knop J. und Enk A.H. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with

regulatory properties isolated from peripheral blood J. Exp. Med. 193, 1285-1294 (2001); Thornton A.M. und Shevach E.M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. J. Exp. Med. 188, 287-296 (1998); Suri-Payer E., Amar A.Z., Thornton A.M., Shevach E.M. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. J. Immunol. 160, 1212-1218 (1998) und Piccirillo und Shevach Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. J. Immunol. 167, 1137-1140 (2001)).

Die Tatsache, dass die supprimierenden Eigenschaften zellkontaktabhängig sind, macht deutlich, dass insbesondere Treg-spezifische Oberflächenproteine einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität der Zellen haben und die Basis bilden für die gezielte Ausnutzung dieser Eigenschaften zu therapeutischen und diagnostischen Zwecken im Bereich von Allergien, Autoimmunerkrankungen, Chronischer Inflammation, Immundefizienz-Erkrankungen, Transplantatabstoßung und Krebserkrankungen.

Mit Hilfe der Proteomanalyse wurde gezielt die Proteinzusammensetzung der einzelnen T-Zellsubpopulationen, insbesondere der Treg (CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁺β7⁻ Subpopulationen), untersucht und spezifisch Treg - eigene Proteine identifiziert.

Überraschender Weise konnten mit Hilfe der Proteomanalyse β -Galactosidase-bindende Proteine (kurz: Galectine, im Folgenden) wie Galectin-1 und Galectin-10 (so genanntes Charcot-Leyden Crystal (CLC) Protein) identifiziert werden. Galectine sind z.B. in Ni et al. WO 98 / 015624 A1 und Ackerman et al. US 5,242,807 beschrieben. Jedoch wird die spezifische Eignung der Galectine zur Manipulation und Modifikation von Treg nicht erkannt.

Daher betrifft die Erfindung Treg enthaltende Galectine und deren Isolierung.

Im Rahmen dieser Erfindung wird unter „Treg“ solche T-Zellsubpopulationen verstanden, die humanen Ursprungs sind oder aus Säugetieren stammen können. Bevorzugt sind jedoch erfindungsgemäß die Subpopulationen Treg-CD4⁺CD25⁺ und Treg-CD4⁺CD25⁺ β 7⁺. „Isolierte Treg“ sind ex-vivo Zellen (außerhalb des lebenden Körpers) und ggfs. von anderen T-Zellen getrennt.

Mittels Isolation ist ebenfalls eine Anreicherung von Treg-Zellen enthaltend Galectin möglich (siehe Beispiele).

Der Begriff „native Treg“ beschreibt „in-vivo“ (innerhalb des lebenden Körpers) vorzufindende Treg, z.B. im menschlichen Blut oder Thymus oder von Säugetieren.

„Galectine“ im Sinne dieser Erfindung sind solche Proteine mit der Funktion eines β -Galactosidase-bindenden Proteins, also solche Galectine, wie Galectin 1-10 als humanes Galectin oder

als homologes Galectin aus Säugetieren. Bevorzugt sind jedoch erfindungsgemäß Galectin 1 oder 10, insbesondere gemäß einer der Sequenzen SEQ ID No. 1 - 5. Des weiteren kann Galectin 10 als SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 in seinen Isoformen auftreten und zwar: a.) apparentes Molekulargewicht von 14 kDa und einen pI von 6,7, b.) apparentes Molekulargewicht von 13,5 kDa und einen pI von 5,9, c.) apparentes Molekulargewicht von 13 kDa und einen pI von 5,9.

Ebenfalls können die erfindungsgemäßen Galectine modifiziert sein, z.B. mittels posttranslationalen Modifikationen, wie Glykolisierung.

Beispiele von Galectinen sind gegeben in WO 98 / 015624 A1 und Galectin 10 ist offenbart in Ackerman et al. US 5,242,807.

Diese Galectine sind erfindungsgemäß mit eingeschlossen.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Treg enthaltend Galectine, dahingehend rekombinant verändert,

ass sie eine erfindungsgemäße Aminosäuresequenz, vorzugsweise SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 2 oder SEQ ID No. 4, oder erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise SEQ ID no. 6 oder SEQ ID No. 7, enthalten.

Daher betrifft die Erfindung ebenfalls die Aminosäuresequenzen SEQ ID No. 1-5 bzw. Polypeptide oder Proteine und deren codierenden Nukleinsäuresequenzen. Insbesondere SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 (Galectin 10) zeigen lediglich eine Übereinstimmung von 60 % mit entsprechenden angegebenen

Sequenzen in WO 98 / 015624 A1. Dies ist in der erfindungsgemäßen spezifischen Treg-Herkunft begründet. Daher betrifft die Erfindung auch solche Aminosäure-Sequenzen die eine Sequenzidentität oder Homologie von 70% und mehr, vorzugsweise von 80% und mehr, besonders bevorzugt von 90-95% und mehr mit SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 aufweisen. Ebenfalls mit eingeschlossen sind ebenfalls solche analoge Aminosäure-Sequenzen, die aufgrund des Austausches von einer oder mehreren Aminosäure(n) in diesen Sequenzen, dennoch die gewünschte Funktion eines Galectins gewährleisten.

In einer weiteren Ausführungsform sind ebenfalls Fusionsproteine betroffen, enthaltend eine erfindungsgemäße Aminosäuresequenz oder ein genanntes Galectin als eine Teilsequenz. Beispiele für rekombinante Fusionsproteine sind gegeben in EP- 0282 042 B1.

Des weiteren betrifft die Erfindung Nukleinsäuren, die für ein Galectin kodieren und zwar vorzugsweise für ein Galectin erhältlich aus einem Treg oder für die erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen codieren.

Insbesondere können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 6 sein, codierend für SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 (Galectin 10) oder eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 7 sein, codierend für SEQ ID No. 4 (Galectin 1).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine Poly(A)-Sequenz, eine oder mehrere Erkennungssequenzen sowie, falls erforderlich, eine oder mehrere potentielle N-Glykosylierungsstellen. Die nicht-kodierenden Sequenzen sind regulatorische Sequenzen, wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, zur kontrollierten Expression des kodierenden Gens, enthaltend die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren. Des weiteren können solche Nukleinsäuren Gegenstand von üblichen Expressionsvektoren, üblichen Wirtszellen oder üblichen gentherapeutischen Vektoren sein (z.B. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA oder Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)).

Der Begriff „Nukleinsäure“ (synonym: Polynukleotid) hat die Bedeutung im Sinne von DNS oder RNS oder chemischen Analoga und dergleichen.

Die erfindungsgemäßen Galectine werden sekretiert und sind in der Lage, auf Treg membranständige Proteine (z.B. Rezeptoren) zu binden. Darüber hinaus können sie solche membranständigen Proteine quervernetzen und daher deren Funktionen beeinflussen und regulieren. Diese Eigenschaft kann erfindungsgemäß genutzt werden, um die Interaktion zwischen Treg und T-Effektorzellen zu beeinflussen zwecks Behandlung von Krankheiten die mit Treg

in Verbindung stehen. Daher betrifft die Erfindung solche Treg, wobei mindestens ein Galectin sekretiert, membranständig oder auf der Oberfläche eines Treg präsentiert ist.

Mit Hilfe von rekombinanten Methoden kann mindestens ein Galectin in Treg oder auf der Oberfläche des Treg angereichert werden. Hierzu kann eine erfindungsgemäße Aminosäuresequenz oder Nukleinsäure in Treg eingebracht werden.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen

„Treg enthaltend Galectine“, dahingehend rekombinant verändert, dass sie eine erfindungsgemäße Aminosäuresequenz, vorzugsweise SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 oder SEQ ID No. 4, oder erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise SEQ ID No. 6 oder SEQ ID No. 7, enthalten.

Die Erfindung betrifft weiterhin Binder an mindestens einer isolierten T-regulatorischen Zelle oder nativen T-regulatorischen Zelle enthaltend mindestens ein Galectin. Die Binder können nicht abschließend ausgewählt werden aus der Gruppe: Inhibitor, Agonist, Antagonist, Sonde, Antikörper oder Immunmodulator.

Der Binder kann auch ein Signal induzieren, wie eine Farbreaktion, radioaktive Markierung, welches genügt ein Treg enthaltend Galectine zu identifizieren und zu modifizieren. Daher ist der Binder eine „Sonde“. Im weitesten Sinne ist daher der Binder erfindungsgemäß ebenfalls ein adressiertes Molekül, welcher an einen geeigneten signal-vermittelnden

Rezeptor an Treg enthaltend Galectin bindet und aufgrund des enthaltenden Galectins in Treg eine Rückkopplung erzeugt.

Beispielsweise können mittels eines Inhibitors oder Modulators Galectine in Treg vorteilhaft angereichert werden. Mit Hilfe einer Sonde können ebenfalls z.B. weitere Treg Zellen enthaltend Galectine identifiziert werden. Eine solche Sonde ist beispielsweise ein Antikörper, der spezifisch ein oder mehrere vorhandene Epitope auf den erfindungsgemäßen Aminosäure-Sequenzen (z.B. SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2) oder Galectinen erkennt (Herstellung z.B. einschlägig nach Köhler).

In einer funktionellen Betrachtungsweise haben die Binder die Funktion, den isolierten Treg oder nativen Treg enthaltend mindestens ein Galectin zu aktivieren oder zu deaktivieren.

Daher sind die Treg enthaltende Galectine oder Binder als Arzneimittel geeignet, vorzugsweise zur Behandlung von Erkrankungen und zwar Allergien, Autoimmunerkrankungen, insbesondere Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose oder Morbus Crohn, Chronischer Inflammation, Immundefizienz-Erkrankungen, Transplantatabstoßung und Krebserkrankungen.

Insbesondere solche Autoimmunerkrankungen ausgewählt aus der Gruppe: Alopecia Areata, Morbus Bechterew, Antiphospholipid-Syndrom, Morbus Addison, Morbus Behcet, Zöliakie Sprue, chronische Müdigkeitssyndrom (Chronic Fatigue Immune

Dysfunction Syndrome (CFIDS)), Polyneuropathie, Churg-Strauss Syndrom (Granulomatose), CREST-Syndrom (Raynaud-Syndrom), Cold Agglutinin Disease, Kryoglobulinämie, Fibromyalgie, Fibromyositis, Morbus Basedow, Guillain -Barré-Syndrom, idiopathische pulmonäre Fibrose, idiopathische Thrombozytopenie, IgA Nephropathie, Lichen Planus, Morbus Ménière, Polyarteritis Nodosa, Polychondritis, Polyglandular-Syndrom, Polymyalgia Rheumatica, Primary Agammaglobulinemie, Biliäre Cirrhose, Psoriasis, Morbus Reiter, Sarkoidose, Morbus Sjögren, Takayasu-Arteritis, Vasculitis, Vitiligo, Wegeners Granulomatose.

Isolierte Treg enthaltend Galectine, entsprechend erfindungsgemäß modifiziert, können dem zu behandelnden Körper appliziert werden. Zum anderen können geeignete Binder dem Patienten in ausreichender Dosierung verabreicht werden. Die Treg enthaltende Galectine und/oder Binder werden hierzu ggfs. mit weiteren Hilfsstoffen formuliert.

Des weiteren betrifft die Erfindung ein Diagnostikum (Synonym: Array oder Assay) enthaltend zumindest einen Binder und mindestens einen Treg enthaltend Galectine, zur Identifikationen geeigneter Binder oder Treg.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur näheren Erläuterung der Erfindung, ohne die Erfindung auf diese zu beschränken. Zudem werden Figuren und Sequenzen erläutert.

Beispiele

Isolierung und funktionelle Analyse humaner Treg

Die Isolierung der T-Zellen erfolgte aus PBMC (peripheral blood mononuclear cells), die durch eine Standard-Dichtegradientenzentrifugation aus normalen buffy coats oder Leukapherisaten gesunder humaner Spender.

Multisort positive Selektion von $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^+\beta7^+$ T Zellen

Die Isolierung von Treg erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurden $CD4^+$ T-Zellen mit Hilfe des CD4-MACS-Multisort-Kits (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany) isoliert und daraus mit anti-CD25-FITC (M-A251, BD PharMingen, San Diego, USA) und anti-FITC-Multisort Beads (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany) die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen. Daran anschließend wurden B-Zellen, Makrophagen und $CD8^+$ T-Zellen mittels CD19, CD14 und CD8 Dynabeads (Dynal, Hamburg, Germany) depletiert. Für die Isolierung von $CD4^+CD25^+\beta7^+$ Treg (Subpopulation der $CD4^+CD25^+$ Treg) wurden $\beta7$ -PE und anti-PE Beads (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany) verwendet. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mit der FACS-Analyse kontrolliert.

Funktionelle Analyse humaner frisch isolierter $CD4^+CD25^+$ T Zellen

CD25 ist ein typisches Oberflächenmolekül auf Treg, jedoch wird es nicht nur in diesem Zelltyp exprimiert. Aus diesem Grund wurde vor jeder Analyse eine funktionelle Kontrolle der supprimierenden Eigenschaften der isolierten Zellen durchgeführt.

Polyklonale Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 monoklonalen Antikörpern

Eine konstante Anzahl von konventionellen $CD4^+$ T-Zellen (1×10^5 /Kavität) kann polyklonal aktiviert werden und zwar mit anti-CD3 (1 μ g/ml, OKT-3) und anti-CD28 monoklonalen Antikörpern (2 μ g/ml, CD28.2) in Gegenwart von einer variierenden Anzahl von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (Verhältnis 1:1 bis 1:4). Die T-Zellproliferation wurde gemessen nach drei Tagen Kultivierung und einer anschließenden 16stündigen gepulsten Behandlung mit 3HTdR (37 kBq/well). Die derart getesteten Zellen wurden für die Proteomanalysen verwendet.

Gesamtzelllysate aus kultivierten Zellen für die 2DE

Die Extraktion der Proteine aus den Zellen nach einer Zelllyse erfolgte nach einer leicht modifizierten Methode nach Klose (Klose, J. und Kobalz, U., Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. Electrophoresis 16, 1034-1059 (1995) und Klose, J. Fractionated extraction of total tissue proteins from mouse and human for 2-D electrophoresis. Methods Mol Biol 112, 67-85 (1999)). Die Zellen wurden in

einem Phosphat-Puffer, der Proteaseinhibitoren gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Proteasen enthielt mechanisch mittels Ultraschall und Glaskugeln lysiert. Die 2D-Gelelektrophorese störenden Nukleinsäuren wurde bei Raumtemperatur innerhalb von 20 min durch Zugabe der Nuklease Benzonase verdaut. Die Proteine wurden in einem Harnstoff- und Thioharnstoffhaltigem Puffer mit Zusatz von DTT gelöst. Für die Isoelektrische Fokussierung der Proteine wurden Servalyte 2-4 zugesetzt.

Proteintrennung mittels 2DE

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) der Proteine erfolgte nach der Methode von Klose (Klose, J., Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik, 26, 231-243 (1975)) mit Trägerampholyten in Rundgelen aus Polyacrylamid unter reduzierenden Bedingungen. Die Trennungen wurden in einem pH-Bereich von 2 bis 11 durchgeführt, wobei die Länge der IEF-Gele 40 cm betrug. Die Proteinseparation der über IEF separierten Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte in 15%igen Polyacrylamidgelen. Vor dem Auftrag auf das Gel für die SDS-PAGE wurden die IEF-Gelstränge zweimal mit Laufpuffer (0,3 % (w/v) Tris Base, 1,44 % (w/v) Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) gewaschen, um überschüssiges DTT zu entfernen. Anschließend wurde der Gelstrang luftblasenfrei auf das SDS-Gel gelegt und mit einer 1%igen Agaroselösung (mit Bromphenolblau) fixiert.

Der Eintritt der Proteine in das Gel erfolgte bei 65 mA für 15 min und die Trennung innerhalb von ca. 5 h bei 100 mA für 0,75 mm dicke analytische Gele bzw. bei 75 und 200 mA für 1,0 bzw. 1,5 mm dicke präparative Gele. Die Trennstrecke betrug 30 cm.

Visualisierung der Proteine

Um eine möglichst hohe Empfindlichkeit in der Proteindetektion zu erlangen, erfolgte die Färbung analytischer Gele mit Silber nach einer modifizierten Methode von Heukeshoven und Dernick (Heukeshoven, J. und Dernick, R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit.

I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. Electrophoresis 9, 28-32 (1988)) modifiziert nach Klose und Kobalz (Klose, J. und Kobalz, U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. Electrophoresis 16, 1034-1059 (1995)). Da diese

Methode einen Zusatz von Glutardialdehyd und Formaldehyd

nutzt, um die Empfindlichkeit zu erhöhen, ist eine

anschließende massenspektrometrische Identifizierung der

Proteine kaum möglich. Aus diesem Grund wurde bei Bedarf eine

modifizierte Variante der mit Massenspektrometrie kompatiblen

Färbung nach Blum et al. (Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J.

Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in

polyacrylamide gels. Electrophoresis, 8, 93-99 (1987))

eingesetzt. Die kolloidale Coomassie-Färbung nach Neuhoff et

al. (Neuhoff V., Arold N., Taube D. und Ehrhardt W., Improved

staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 9, 255-262. (1988)) mit Coomassie Brilliant Blue G-250 wurde für die Proteine in präparativen 2DE-Gelen verwendet, die massenspektrometrisch untersucht wurden. Alternativ, insbesondere für Proteine, die mit der kolloidale Coomassie-Färbung nicht angefärbt werden konnten wurden mit Silber nach einem modifizierten Protokoll ohne den Zusatz von glutardialdehyd (Blum) angefärbt.

Differenzielle Proteomanalyse

Das Digitalisieren der Polyacrylamidgele erfolgte bei silbergefärbten Gelen für die Bildauswertung nach dem Trocknen der Gele mit einem Durchlichtscanner.

Die quantitative Auswertung der relativen Proteinintensitäten erfolgte mit einer speziellen, für diese Analysen geeigneten Bildauswertungssoftware (ProteomWeaver Vers. 2.0, Definiens, Deutschland).

Proteinidentifizierung

Die mit Hilfe der Bildauswertung gefundenen Proteine wurden manuell aus den Gelen herausgeschnitten. Mit Hilfe eines Waschroboters wurden die Gelstücke abwechselnd jeweils dreimal alternierend mit jeweils 10 µl Verdaupuffer (10 mM NH_4HCO_3) bzw. Verdaupuffer/Acetonitril 1:1 gewaschen, um den Farbstoff

und Pufferzusätze zu entfernen. Bei silbergefärbten Spots wurde das Silber vor dem Waschen durch Zugabe von 15 µl Entfärbelösung (100 mM Kaliumhexacyanoferrat(III)/30 mM Natriumthiosulfat, 1:1) bei Raumtemperatur innerhalb von ca. 1 min oxidiert. Anschließend wurden die Gelstücke in der Vakuumzentrifuge dehydratisiert und mit jeweils 2 µl einer Trypsinlösung (0,05 µg/µl Trypsin in Verdaupuffer) versetzt. Die proteolytische Spaltung erfolgte bei 37 °C für mindestens 4 h oder über Nacht. Die entstandenen Proteolyseprodukte wurden innerhalb von 30 min durch Zugabe von 5 µl 0,1%iger TFA bei Raumtemperatur aus der Gelmatrix extrahiert.

MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Bestimmung der Peptidmassen von proteolytisch gespaltenen Proteinen erfolgte mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer des Typs Ultraflex (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland). Bei dieser Methode werden die Analytmoleküle (Peptide) in einer UV-aktiven Matrix kokristallisiert. Für die Matrixlösung wurde eine gesättigte α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure-Lösung in 50 % Acetonitril/0,1 % TFA 1:1 (Lösung A) mit Lösung A im Verhältnis 1:1 verdünnt. Vor den Messungen wurden die Peptide zur Anreicherung an C₁₈-Material in ZipTips™ (aktiviert durch 10 µl 0,1 % TFA) durch mehrmaliges Aufziehen der Analytlösung adsorbiert, einmal mit 10 µl 0,1 % TFA gewaschen und anschließend mit 1,2 µl Matrixlösung auf den Probenhalter eluiert. Die sogenannten Peptidmassenfingerprintspektren (PMFs) der auf dem Probenhalter getrockneten Proben wurden bei

folgenden Einstellungen vermessen: Akquisitionsmethode:
Reflektor, Spannungspolarität: positiv,
Beschleunigungsspannung: 25 kV, Reflektorspannung: 26,3 kV,
Linsenspannung: 6,2 kV, Reflektordetektorspannung: 1,72 kV und
Deflektionsspannung: 0 kV

Die Kalibrierung der Massenspektren erfolgte durch einen Kalibrierungsalgorithmus der Proteinscape®-Datenbank (Bruker-Daltonik) automatisch auf Autoproteolyseprodukte des Trypsins und auf bekannte, immer wieder in den Spektren vorkommende Peptide aus Kontaminationen wie z.B. Keratin.

Die Peptidmassen-Spektren wurden unter Zuhilfenahme einer nichtredundanten NCBI Proteindatenbank mit Hilfe der Metasuchmaschine aus Proteinscape® und den Suchalgorithmen MASCOT und ProFound (Version 2002.03.01) analysiert.

Auswertung:

Bei dem Vergleich der unterschiedlichen T-Zellpopulationen wurde eine Erhöhung der Proteinmenge des Charcot-Leyden Crystal Proteins (Galectin 10) in stimulierten und nicht stimulierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen gegenüber den nicht stimulierten CD4⁺ T-Zellen gefunden. Diese Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen humanen Spendern gefunden. Bei zwei Spendern wurde eine Erhöhung der Proteinmenge des Charcot-Leyden Crystal Proteins auch in einer stimulierten

CD4⁺CD25⁺β7⁺ T-Zell-Subpopulation (Treg) gefunden (Figur 1, Figur 2, Figur 3).

Das Charcot-Leyden Crystal Protein wurde in den Gelen in drei Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt detektiert und identifiziert.

Isoform 1 (Spot 68) hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 14 kDa und einen pI von 6,7, Isoform 2 (Spot 33) hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 13,5 kDa und einen pI von 5,9, Isoform 3 (Spot 34) hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 13 kDa und einen pI von 5,9.

Alle Isoformen wurden als Charcot-Leyden Crystal Protein (Galectin 10) identifiziert (SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2). Die drei Isoformen zeigten bei den untersuchten T-Zell-Populationen eine Koregulation.

Galectin 1 (SEQ ID No. 4) wurde ebenfalls in einer höheren Proteinkonzentration in den in stimulierten und nicht stimulierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen gegenüber den nicht stimulierten CD4⁺ T-Zellen gefunden.

Diese Ergebnisse wurden in vier unabhängigen humanen Spendern gefunden. Bei zwei Spendern ließ wurde eine Verringerung der Proteinmenge des Galectin 1 in CD4⁺CD25⁺β7⁺ T-Zell-Subpopulation (Treg) gefunden (Figur 4).

Vergleichende Untersuchungen an denselben Zellpopulationen wurden auch bei Mäusen durchgeführt (verwendeter Inzuchtstamm: BALB/c). Die Sequenzen der entsprechenden Galectin-Proteine sind SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 5.

Erläuterung der Sequenzen:

SEQ ID No. 1, Human Charcot-Leyden Crystal Protein (Galectin 10):

1HDK

A Chain A, Charcot-Leyden Crystal Protein - Pcmb Complex

ACCESSION 1HDK; gi|17942629

Organismus: Homo sapiens

SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFGRRVV

MNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKPEAVKMQ

VWRDISLTKFNVSYLKR

SEQ ID No. 2:

Q05315

Eosinophil lysophospholipase (Charcot-Leyden crystal protein). (Lysolecithin acylhydrolase) (CLC) (Galectin-10).

ACCESSION: Q05315; gi|547870

Organismus: Homo sapiens

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFGRRV

VMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKPEAVKMQ

QVWRDISLTKFNVSYLKR

SEQ ID No. 3, Maus Charcot-Leyden crystal protein homolog:

P97400

Eosinophil lysophospholipase (Charcot-Leyden crystal protein homolog) (Lysolecithin acylhydrolase) (CLC) (Galectin-10).

ACCESSION: P97400; gi|2829838

Organismus: Mus musculus

der

AAB41694

Charcot-Leyden crystal protein ortholog

ACCESSION: AAB41694; gi|1813526

Organismus: Mus musculus

EPYLQVDFHTEMKEDSDIAFHSRVYFGHWVVMNSRVNGAWQYEVTCHNMPFQDGKPFNLSIS
VPPDKY

SEQ ID No. 4, Human Galectin-1:

NP_002296

beta-galactosidase binding lectin precursor; Lectin,
galactose-binding, soluble, 1; galectin

Organismus: Homo sapiens

ACCESSION NP_002296 ; gi|4504981

MACGLVASNLNLKPGECLRVGEVAPDAKSFVLNLGKDSNNLCLHFNPRFNAHGDANTIVCN
 SKDGGAWGTEQREAVFPFQPGSVAEVCITFDQANLTVKLPDGYEFKFPNRLNLEAINYMAAD
 GDFKIKCVAFD

SEQ ID No. 5, Maus Galectin-1:

P16045

Galectin-1 (Beta-galactoside-binding lectin L-14-I) (Lactose-
 binding lectin 1) (S-Lac lectin 1) (Galaptin) (14 kDa lectin)

ACCESSION: P16045, gi|126172

MACGLVASNLNLKPGECLKVRGEVASDAKSFVLNLGKDSNNLCLHFNPRFNAHGDANTIVCN
 TKEDGTWGTEHREPAFPFQPGSITEVCITFDQADLTIKLPDGHEFKFPNRLNMEAINYMAAD
 GDFKIKCVAFE

SEQ ID No. 6, Nukleinsäure kodierend für eine
Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2
(Galectin 10):

CAATTCAGAAGAGCCACCCAGAAGGAGACAACAATGTCCCTGCTACCCGTGCCATACACAGA
 GGCTGCCTCTTTGTCTACTGGTTCTACTGTGACAATCAAAGGGCGACCACTTGTCTGTTTCT
 TGAATGAACCATATCTGCAGGTGGATTTCCACACTGAGATGAAGGAGGAATCAGACATTGTC
 TTCCATTTCCAAGTGTGCTTTGGTCGTCGTGTGGTCATGAACAGCCGTGAGTATGGGGCCTG
 GAAGCAGCAGGTGGAATCCAAGAACATGCCCTTTCAGGATGGCCAAGAATTTGAACTGAGCA
 TCTCAGTGCTGCCAGATAAGTACCAGGTAATGGTCAATGGCCAATCCTCTTACACCTTTGAC
 CATAGAATCAAGCCTGAGGCTGTGAAGATGGTGCAAGTGTGGAGAGATATCTCCCTGACCAA
 ATTTAATGTCAGCTATTTAAAGAGATAACCAGACTTCATGTTGCCAAGGAATCCCTGTCTCT

ACGTGAACTTGGGATTCCAAAGCCAGCTAACAGCATGATCTTTTCTCACTTCAATCCTTACT
CCTGCTCATTA AAACTTAATCAA ACTTCAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID No. 7, Nukleinsäure kodierend für eine
Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 4 (Galectin 1):

ATCTCTCTCGGGTGGAGTCCTTCTGACAGCTGGTGCGCCTGCCCCGGGAACATCCTCCTGGAC
TCAATCATGGCTTGTGGTCTGGTCGCCAGCAACCTGAATCTCAAACCTGGAGAGTGCCTTCG
AGTGCGAGGCGAGGTGGCTCCTGACGCTAAGAGCTTCGTGCTGAACCTGGGCAAAGACAGCA
CAACCTGTGCCTGCACTTCAACCCTCGCTTCAACGCCCCACGGCGACGCCAACACCATCGTG
TGCAACAGCAAGGACGGCGGGGCTGGGGGACCGAGCAGCGGGAGGCTGTCTTCCCTTCCA
GCCTGGAAGTGTGTCAGAGGTGTGCATCACCTTCGACCAGGCCAACCTGACCGTCAAGCTGC
CAGATGGATACGAATTCAAGTCCCCAACCGCCTCAACCTGGAGGCCATCAACTACATGGCA
GCTGACGGTGACTTCAAGATCAAATGTGTGGCCTTTGACTGAAATCAGCCAGCCCCATGGCCC
CCAATAAAGGCAGCTGCCTCTGCTCCCCTG

Erläuterung der Figuren:

Fig. 1

Anderung der Proteinkonzentration von Charcot-Leyden Crystal Protein Isoform 1 (Spot 68) bei dem Vergleich humaner regulatorischer T-Zellen (CD4+CD25+ und CD4+CD25+β7+) mit konventionellen T-Zellen (CD4+) nach polyklonaler Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. Die Pfeile zeigen die differenziellen Proteinspots.

Fig. 2

Änderung der Proteinkonzentrationen von Charcot-Leyden Crystal Protein Isoform 2 (Spot 33) und Isoform 3 (Spot 34) bei dem Vergleich humaner regulatorischer T-Zellen (CD4+CD25+ und CD4+CD25+ β 7+) mit konventionellen T-Zellen (CD4+) nach polyklonaler Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. Die Pfeile zeigen die differenziellen Proteinspots.

Fig. 3

Änderung der Proteinkonzentration von Charcot-Leyden Crystal Protein Isoform 1 (Spot 68) bei dem Vergleich von stimulierten versus nicht stimulierten humanen regulatorischen T-Zellen (CD4+CD25+ und CD4+CD25+ β 7+) und konventionellen T-Zellen (CD4+). Die Pfeile zeigen die differenziellen Proteinspots.

Fig. 4

Änderung der Proteinkonzentration von Galectin 1 im Vergleich humaner regulatorischer T-Zellen (CD4+CD25+ und CD4+CD25+ β 7+) mit konventionellen T-Zellen (CD4+) nach polyklonaler Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. Die Pfeile zeigen die differenziellen Proteinspots.

Patentansprüche

1. Isolierte T-regulatorische Zelle enthaltend mindestens ein Galectin.
2. Isolierte T-regulatorische Zelle nach Anspruch 1, ausgewählt aus der Gruppe CD4+CD25+ oder CD4+CD25+ β 7+.
3. Isolierte T-regulatorische Zelle nach einem der Ansprüche 1 oder 2, enthaltend mindestens ein Galectin ausgewählt aus der Gruppe Galectin 1-10.
4. Isolierte T-regulatorische Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, enthaltend ein humanes Galectin oder ein homologes Galectin aus Säugetieren.
5. Isolierte T-regulatorische Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, enthaltend mindestens ein Galectin ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 5.
6. Isolierte T-regulatorische Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, enthaltend mindestens ein Galectin ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 mit den Isoformen: a.) apparentes Molekulargewicht von 14 kDa und einen pI von 6,7, b.) apparentes Molekulargewicht von 13,5 kDa und einen pI von 5,9, c.) apparentes Molekulargewicht von 13 kDa und einen pI von 5,9.

7. Isolierte T-regulatorische Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Galectin sekretiert, membranständig oder auf der Oberfläche der T-regulatorischen Zelle präsentiert ist.
8. Isolierte T-regulatorische Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Galectin in der T-regulatorischen Zelle oder auf der Oberfläche der T-regulatorischen Zelle angereichert ist.
9. Isolierte T-regulatorische Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Nukleinsäure kodierend für mindestens ein Galectin enthaltend ist und ggfs. eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine Poly(A)-Sequenz und/oder Erkennungssequenzen und/oder regulatorische Sequenzen, wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen umfasst.
10. Isolierte T-regulatorische Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus SEQ ID No. 6 oder SEQ ID No. 7.
11. Binder an mindestens einer isolierten T-regulatorischen Zelle oder nativen T-regulatorischen Zelle enthaltend mindestens ein Galectin.
12. Binder nach Anspruch 11, ausgewählt aus der Gruppe Inhibitor, Agonist, Antagonist, Sonde, Antikörper oder Immunmodulator.

13. Binder nach einem der Ansprüche 11 oder 12, dass die isolierten T-regulatorischen Zelle oder nativen T-regulatorischen Zelle enthaltend mindestens ein Galectin aktiviert oder deaktiviert wird.
14. Arzneimittel enthaltend mindestens einen Binder nach einem der Ansprüche 11 bis 13 oder isolierte T-regulatorischen Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
15. Arzneimittel nach Anspruch 14 zur Behandlung von Erkrankungen und zwar Allergien, Autoimmunerkrankungen, insbesondere Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose oder Morbus Crohn, Chronischer Inflammation, Immundefizienz-Erkrankungen, Transplantatabstoßung und Krebserkrankungen.
16. Arzneimittel nach Anspruch 15, wobei die Autoimmunerkrankungen ausgewählt ist aus der Gruppe: Alopecia Areata, Morbus Bechterew, Antiphospholipid-Syndrom, Morbus Addison, Morbus Behcet, Zöliakie Sprue, chronische Müdigkeitssyndrom (Chronic Fatigue Immune Dysfunction Syndrome (CFIDS)), Polyneuropathie, Churg-Strauss Syndrom (Granulomatose), CREST-Syndrom (Raynaud-Syndrom), Cold Agglutinin Disease, Kryoglobulinämie, Fibromyalgie, Fibromyositis, Morbus Basedow, Guillain - Barré-Syndrom, idiopathische pulmonäre Fibrose, idiopathische Thrombozytopenie, IgA Nephropathie, Lichen Planus, Morbus Ménière, Polyarteritis Nodosa, Polychondritis, Polyglandular-Syndrom, Polymyalgia

Rheumatica, Primary Agammaglobulinemie, Biliäre Cirrhose, Psoriasis, Morbus Reiter, Sarkoidose, Morbus Sjögren, Takayasu-Arteritis, Vasculitis, Vitiligo, Wegeners Granulomatose.

17. Diagnostikum enthaltend mindestens einen Binder nach einem der Ansprüche 11 bis 13 oder isolierte T-regulatorischen Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft T-regulatorische-Zellen
enthaltend Galectine zur Therapie und Diagnose von
Erkrankungen, insbesondere von Allergien,
Autoimmunerkrankungen, Chronischer Inflammation,
Immundefizienz-Erkrankungen, Transplantatabstoßung und
Krebserkrankungen.

Fig. 1/4

Vergleich der stimulierten Zellpopulationen

Charcot-Leyden Crystal Protein Ac: gi|17942629
Isoform 1: Spot Nr. 8 bzw. 68

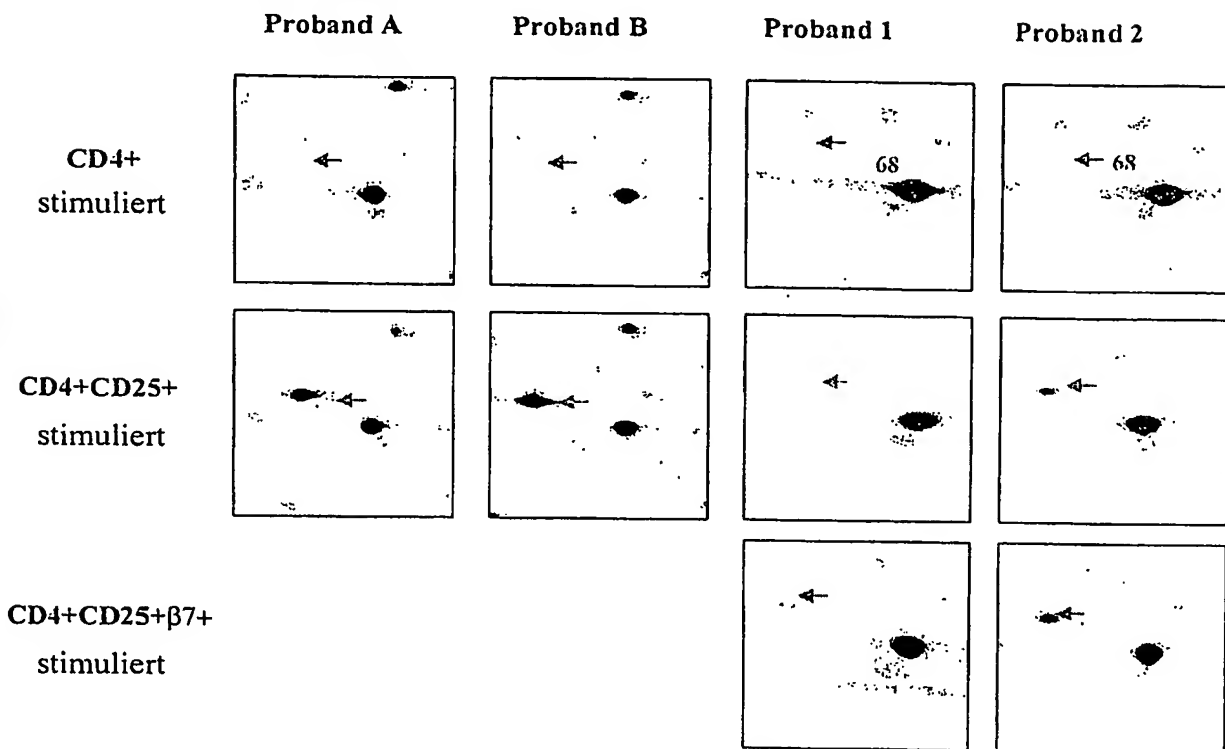


Fig. 2/4

Vergleich der stimulierten Zellpopulationen

Charcot-Leyden Crystal Protein Ac: gi|17942629

Isoform 2 und 3: Spot Nr. 1, 2 bzw. 32, 33

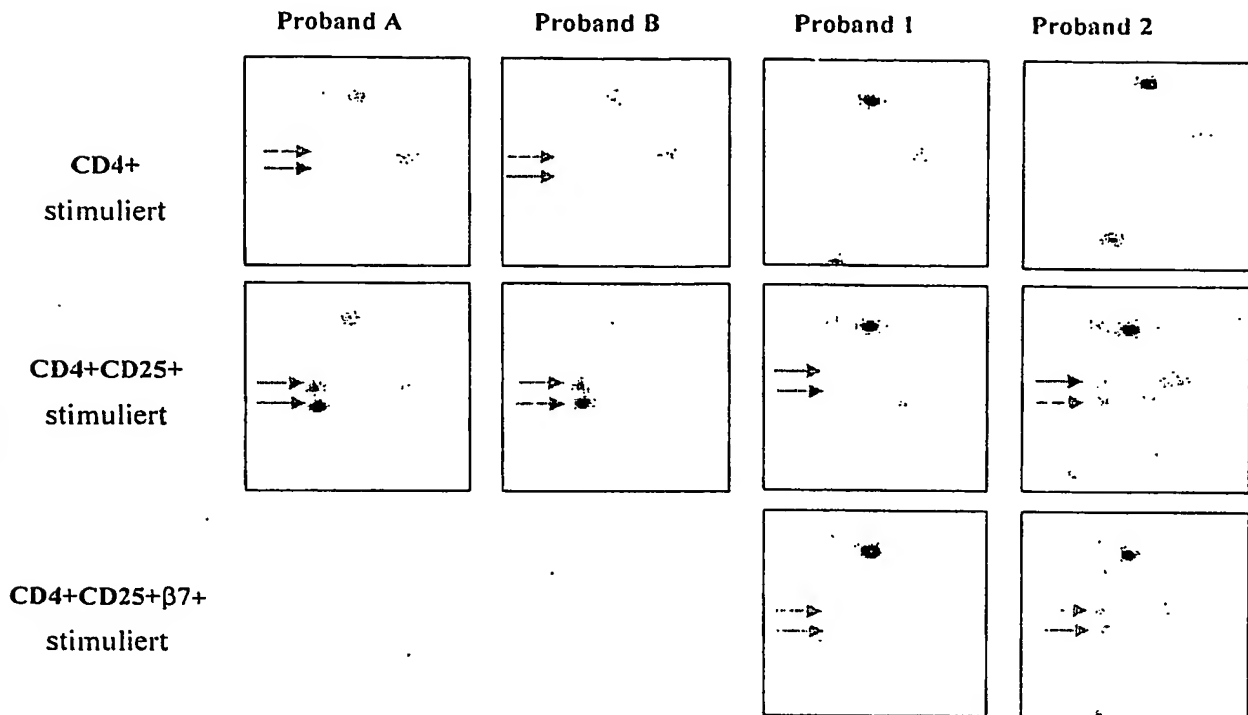
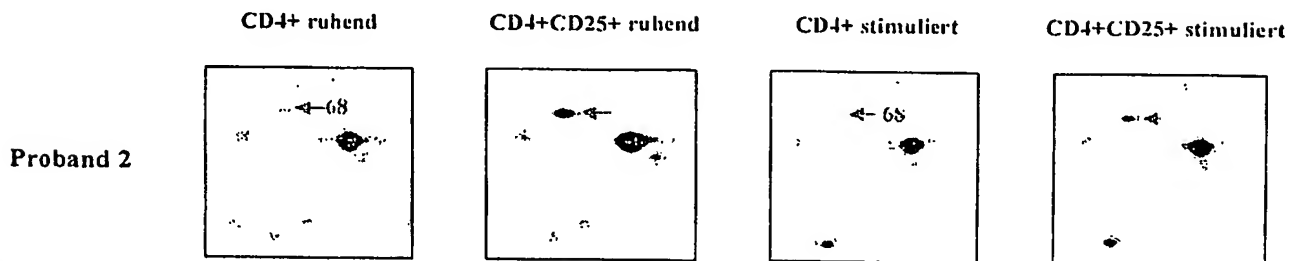


Fig. 3/4

Vergleich der stimulierten und nicht-stimulierten Zellpopulationen

Charcot-Leyden Crystal Protein Ac: gi|17942629

Isoform 1: Spot Nr. 8 bzw. 68



Charcot-Leyden Crystal Protein Ac: gi|17942629

Isoform 2 und 3: Spot Nr. 1, 2 bzw. 32, 33

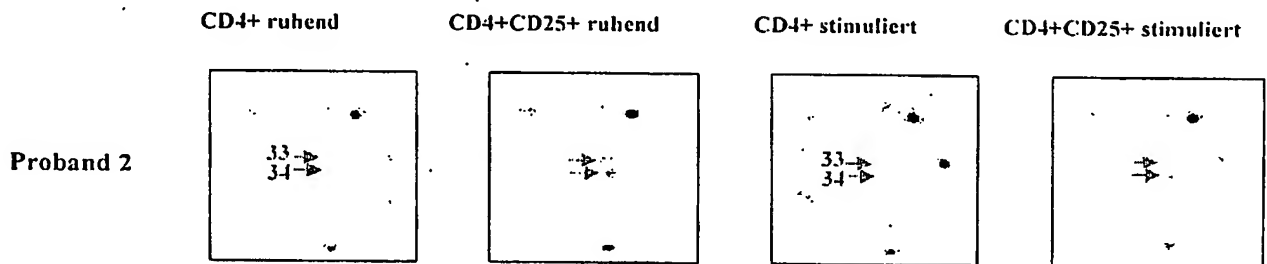


Fig. 4/4

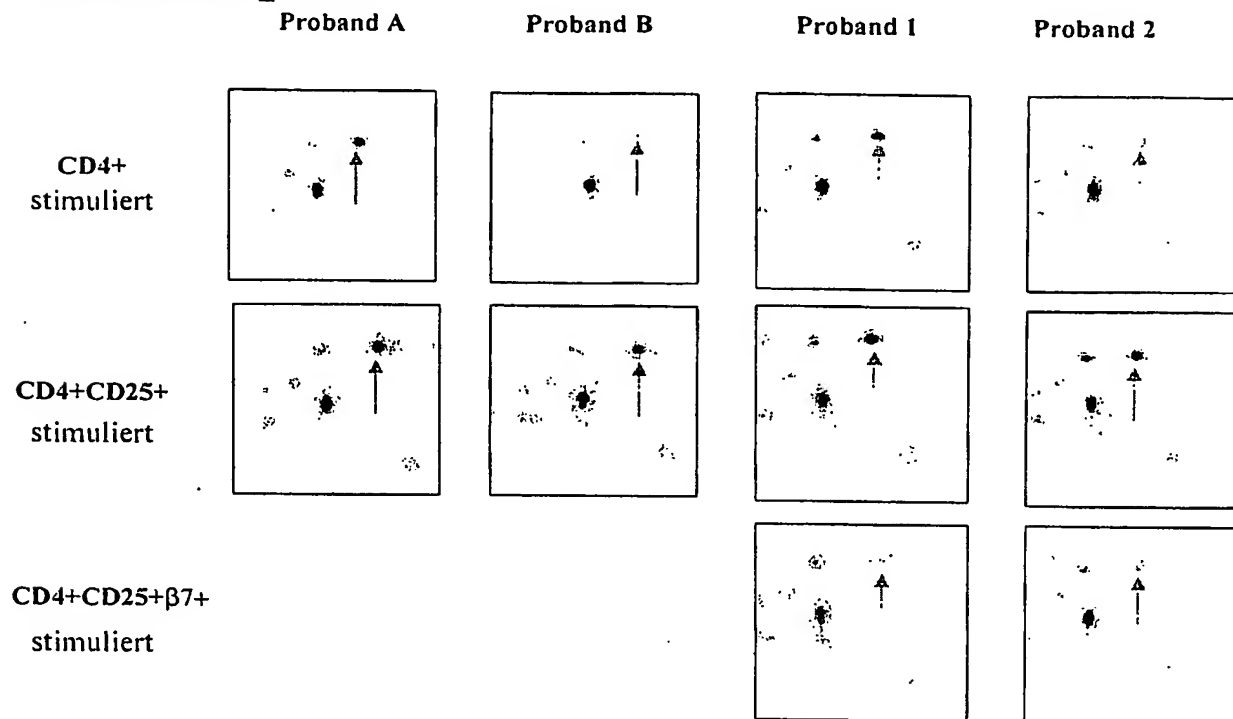
Vergleich der stimulierten Zellpopulationen

Galectin 1: gi|4504981

beta-galactosidase binding lectin precursor; Lectin, galactose-binding, soluble, 1; galectin

Organismus: Homo sapiens

ACCESSION NP_002296



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.